



昆虫病原线虫 *Heterorhabditis beicherriana* LF 品系与 Bt HBF-18 菌株混用对华北大 黑鳃金龟幼虫的防治效果

李而涛¹, 曹雅忠¹, 张 帅¹, 李克斌¹, 李建一¹, 王庆雷², 刘春琴², 尹 姣^{1,*}

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;

2. 沧州市农林科学院, 河北沧州 061001)

摘要:【目的】明确昆虫病原线虫 *Heterorhabditis beicherriana* LF 品系 (LF) 与苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* HBF-18 菌株 (Bt HBF-18) 混用后对华北大黑鳃金龟 *Holotrichia oblita* 幼虫的致病力的协同增效作用, 为该害虫的防治提供新的技术措施。【方法】在室内测定了 LF 在不同使用剂量、不同环境温度及不同土壤湿度条件下对华北大黑鳃金龟 7–10 日龄幼虫的致病力; 通过室内生测测定了 Bt HBF-18 对 LF 存活的影响, 以及 Bt HBF-18 与 LF 两者混用后对 7–10 日龄华北大黑鳃金龟幼虫的防治效果; 同时通过室外盆栽试验测定了两者混用对华北大黑鳃金龟幼虫的防治效果。【结果】华北大黑鳃金龟幼虫死亡率随 LF 施用剂量和处理时间的增加而升高, 其中, 侵染期线虫 (infective juveniles, IJs) 800 IJs/100 μ L 及以上剂量处理 7 d 后幼虫死亡率达到 100%; 25 $^{\circ}$ C 为该线虫侵染的最适宜环境温度; 适宜土壤湿度范围为 14% ~ 20%, 湿度过低或过高都会显著影响其侵染效率。室内生测结果表明, Bt HBF-18 处理 9 d 对华北大黑鳃金龟幼虫的致死中浓度 (LC₅₀) 为 1.44×10^8 CFU/g 土, 此浓度对 LF 的存活基本没有影响。另外, 室内生测和室外盆栽试验结果均表明, 将 LF 与 Bt HBF-18 混用能显著提高对华北大黑鳃金龟幼虫的防治效果, 混用后具有不同程度的加成或协同增效作用。室内生测试验中 LC₅₀ Bt + 200 IJs/100 μ L LF 混用处理 3 d 后, 较单独 LF 和 Bt HBF-18 处理幼虫死亡率分别提高了约 43.07% 和 36.05%, 具有显著的协同增效作用; 室外盆栽试验中 1/2 LC₅₀ Bt + 1 000 IJs/mL LF, LC₅₀ Bt + 1 000 IJs/mL LF 和 1/2 LC₅₀ Bt + 1 500 IJs/mL LF 均具有协同增效作用, 其中 1/2 LC₅₀ Bt + 1 500 IJs/mL LF 增效作用最佳, 较单独 LF 和 Bt HBF-18 处理幼虫死亡率分别提高了约 38.89% 和 80.55%。【结论】将昆虫病原线虫 LF 与 Bt HBF-18 混用对华北大黑鳃金龟幼虫的防治具有加成或协同增效作用。

关键词: 昆虫病原线虫; *Heterorhabditis beicherriana* LF 品系; 苏云金芽孢杆菌 HBF-18 菌株; 华北大黑鳃金龟; 协同增效

中图分类号: Q965.9 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2019)05-0602-13

Bioefficacy of the combined application of entomopathogenic nematode *Heterorhabditis beicherriana* strain LF and *Bacillus thuringiensis* strain HBF-18 against *Holotrichia oblita* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae

LI Er-Tao¹, CAO Ya-Zhong¹, ZHANG Shuai¹, LI Ke-Bin¹, LI Jian-Yi¹, WANG Qing-Lei², LIU Chun-Qin², YIN Jiao^{1,*} (1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of

Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Cangzhou Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Cangzhou, Hebei 061001, China)

Abstract: 【Aim】 This study aims to assess the possible synergistic effect of combined application of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis beicherriana* strain LF (LF) and *Bacillus thuringiensis* strain HBF-18 (Bt HBF-18) based on their pathogenicity to *Holotrichia oblita* larvae, so as to develop a new alternative method for white grub control. 【Methods】 The pathogenicity of LF at different doses to the 7 – 10-day-old larvae of *H. oblita* were investigated at different temperatures and soil moistures in the laboratory. The effects of Bt HBF-18 on the survival of LF, and the bioefficacy of the combined application of nematodes and Bt against the 7 – 10-day-old larvae of *H. oblita* were also investigated in the laboratory. At the same time, the bioefficacy of the combined application of LF and Bt HBF-18 against the 7 – 10-day-old larvae of *H. oblita* was investigated with outdoor pot experiments. 【Results】 The results showed that the larval mortality of *H. oblita* increased with the increase of the application dosage of LF and the treatment duration, with the larval mortality rate reaching 100% at 7 d after treatment with LF at the dosage of 800 IJs/100 μ L and above. Moreover, 25℃ temperature and 14% – 20% soil moisture were proved to be the ideal conditions for the best infection efficiency of LF, and too low or too high humidity significantly affected its infection efficiency. Laboratory bioassays showed that the LC₅₀ of Bt HBF-18 against *H. oblita* larvae after treatment for 9 d was 1.44×10^8 CFU/g soil, and at this concentration Bt HBF-18 showed little effect on the survival of LF. In addition, both the indoor bioassay and outdoor pot experiment revealed that the combined application of LF and Bt HBF-18 could significantly improve their bioefficacy against *H. oblita* larvae, showing additive or synergistic effect. Indoor bioassay showed that the larval mortality rates in the treatment with LC₅₀ Bt + 200 IJs/100 μ L LF for 3 d were increased by about 43.07% and 36.05%, respectively, as compared with that in LF or Bt HBF-18 applied alone, indicating that the combined application of LF and Bt HBF-18 has significant synergistic effect against *H. oblita* larvae. Treatments with 1/2 LC₅₀ Bt + 1 000 IJs/mL LF, LC₅₀ Bt + 1 000 IJs/mL LF and 1/2 LC₅₀ Bt + 1 500 IJs/mL LF in the outdoor pot experiment showed synergistic effect against *H. oblita* larvae, and 1/2 LC₅₀ Bt + 1 500 IJs/mL LF showed the best effect, with the mortality of *H. oblita* larvae increased by about 38.89% and 80.55%, respectively, as compared with that in LF or Bt HBF-18 applied alone. 【Conclusion】 Overall, the interaction between the entomopathogenic nematode LF and Bt HBF-18 against the larvae of *H. oblita* is either additive or synergistic.

Key words: Entomopathogenic nematode; *Heterorhabditis beicherriana* strain LF; *Bacillus thuringiensis* strain HBF-18; *Holotrichia oblita*; synergistic effect

华北大黑鳃金龟 *Holotrichia oblita* 是我国地下害虫的优势类群之一,其幼虫(称为蛴螬)在地下取食多种农作物、林果、牧草、药材和花卉等植物的种子、幼苗根系和地下块茎,导致农作物缺苗断垅,甚至毁种重播(张美翠等, 2014)。随着气候变暖、高毒化学农药的禁用、免耕或浅耕等耕作制度的实施,为蛴螬的存活和数量积累带来了得天独厚的条件,特别是在我国的粮食主产区其为害呈日趋加重之势(裴桂英等, 2010)。据最新统计,2013 年我国农田蛴螬发生面积 8.3×10^6 公顷次,由此造成的产量损失达 46 万吨,折合人民币 15 余亿元(全国农业技术推广服务中心, 2013, 内部资料),而因农产品质量

下降造成的损失更是难以估计。蛴螬在土壤中隐蔽为害,而且危害期长,以化学防治为主,但化学农药过度使用造成的土壤和地下水污染、农药残留等负面影响也相当严重(刘树森等, 2008)。因此,无害化的绿色防治技术愈来愈受到人们高度关注。

在蛴螬的绿色生物防控中昆虫病原线虫(entomopathogenic nematodes, EPNs)的应用最为广泛(颜荀等, 2014)。昆虫病原线虫是昆虫的专性寄生性天敌,属昆虫内寄生线虫,其侵染期幼虫通过昆虫寄主的口器、气门和肛门等自然孔口或直接穿过节间膜(异小杆属)进入寄主体内,穿透肠壁或气管壁进入寄主血腔;由于昆虫病原线虫在寄主体内的

运动和取食,直接造成寄主机械损害,进而引起组织病变。更重要的是昆虫病原线虫携带的共生细菌,这种共生细菌在寄主体内不仅能大量繁殖而且会分泌释放杀虫毒素蛋白,抑制其免疫反应,能够导致寄主在 24 ~ 48 h 内因患败血症而死亡 (Poinar *et al.*, 1990; Boemare *et al.*, 1993; 李慧萍和韩日畴, 2007; 吴文丹等, 2015)。目前,国内外均已筛选出了一些线虫种类或品系并成功地用于蛴螬的防治,例如利用昆虫病原线虫 *Steinernema scarabaei* 可以对圆头犀金龟 *Cyclocephala borealis* 实现有效控制 (Koppenhöfer and Fuzy, 2003); 应用 *Steinernema longicaudum* X-7 (1.0×10^4 IJs/株) 和 *Heterorhabditis bacteriophora* H06 (5.0×10^3 IJs/株) 可有效防治花生田的暗黑鳃金龟 *Holotrichia parallela* 和华北大黑鳃金龟 *Holotrichia oblita* (Guo *et al.*, 2013, 2015)。但昆虫病原线虫在实际应用时防效易受温度、湿度、紫外线等不良因素影响,速效性差、生产成本低、储存困难等局限性也制约了其普及应用 (Shapiro-Ilan *et al.*, 2002, 2006)。同时,由于同种线虫对不同蛴螬种类的敏感性差异较大,且线虫单独施用效果有时不稳定 (Georgis and Gaugler, 1991; Klein, 1993)。目前,人们除了不断分离新的昆虫病原线虫品种或品系用于不同蛴螬的防治,也在寻找其他环境友好型生物制剂与线虫混用以降低防治成本,稳定并提高防治效果。

苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 作为 20 世纪应用最成功的微生物杀虫剂,具有杀虫特异性、对人畜无害、不污染环境等优点 (Bravo *et al.*, 2011; Jouzani *et al.*, 2017)。我国在 2009 年首次筛选到了针对华北大黑鳃金龟幼虫具有较高杀虫活性的 Bt HBF-18 菌株 (Bt HBF-18) (Shu *et al.*, 2009), 该菌株的杀虫晶体蛋白可以高效破坏蛴螬中肠细胞,但是进一步感染效率较低 (黄颖, 2017),在实际应用中速效性较差,一直未能广泛使用。Bt 的主要杀虫物质为芽孢期形成的杀虫蛋白晶体,其在昆虫中肠碱性环境中溶解并被蛋白酶活化,活化后的毒素与中肠上皮细胞表面的特异性受体结合,插入细胞膜形成孔洞,引发上皮细胞裂解 (Kirouac *et al.*, 2002; Vachon *et al.*, 2012), 这些特点为昆虫病原线虫及其共生菌快速进入昆虫的血腔提供了有利条件,为两者联用增效提供了理论基础。但是国内外有关混用昆虫病原线虫与 Bt 提高对靶害虫防效的报道仅有一例,其将 *Steinernema glaseri* 线虫与苏云金芽孢杆菌日本亚种 Buibui 菌株 (*Bacillus*

thuringiensis subsp. *japonensis* str. Buibui 混用提高了对毛犀金龟 *Cyclocephala hirta* 3 龄幼虫的杀虫效果 (Koppenhöfer and Kaya, 1997)。

为了突破昆虫病原线虫和 Bt 在实际生产防治中的局限性,深入发掘两者混用的可能性与发展潜力,我们利用自主筛选获得对蛴螬有效的昆虫病原线虫 *Heterorhabditis beicherriana* LF 品系 (LF), 并选取对华北大黑鳃金龟具有良好杀虫活性的 Bt HBF-18 菌株,首次探讨了这两种生防因子混合施用对优势种蛴螬华北大黑鳃金龟幼虫的防治效果。在明确昆虫病原线虫 LF 对华北大黑鳃金龟幼虫致死作用的适宜条件,以及 Bt HBF-18 菌株对 LF 存活影响的基础上,开展了 LF 与 Bt HBF-18 混用后能否产生协同增效作用的室内生测试验,并进行了相应的室外盆栽试验,以期田间混合应用奠定基础。本研究旨在通过昆虫病原线虫与 Bt 两种生防因子混用对地下害虫华北大黑鳃金龟幼虫的防治效果研究,为华北大黑鳃金龟的生物防治提供技术储备,有助于推动华北大黑鳃金龟的绿色防控技术的研发和产业化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫: 从河北廊坊田间采集华北大黑鳃金龟成虫,集中饲养在铺有土壤的养虫箱 (50 cm × 70 cm) 中,每箱约 200 头,土壤厚 30 cm 左右,土壤湿度约为 15%,温度控制为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,饲喂新鲜榆树叶片,待其产卵后,分批将卵挑出,放在湿度为 18% 的土中孵化,幼虫饲喂新鲜的马铃薯块,待幼虫长到 7 ~ 10 日龄后供后续试验使用。

1.1.2 供试植物: 花生,品种为“鲁花 8 号”。4 月初,在花盆中 ($\Phi = 23$ cm) 加入重约 1 kg 混合土壤 [细壤土与有机质 5:2 (m/m) 混合],在土壤下 3 ~ 4 cm 处点播经过夜浸泡的花生种子 3 颗/盆,待花生苗生长至下针期备室外盆栽试验用。

1.1.3 供试昆虫病原线虫: *Heterorhabditis beicherriana* LF 品系从中国农业科学院廊坊中试基地花生实验田采集的土样中分离获得,其诱集及收集方法参考 White (1927)。线虫用大蜡螟 *Galleria mellonella* 进行活体扩繁,扩繁方法参考 Gaugler (2002)。将收集的侵染期线虫 (infective juveniles, IJs) 转入小烧杯纯化后以浅水层法于 $7 \pm 1^\circ\text{C}$ 保存,时间不超过 15 d (Malan *et al.*, 2011)。

1.1.4 供试菌株: Bt HBF-18 菌株, 由中国农业科学院植物保护研究所生物技术组提供。将 Bt 菌株接种于 LB 固体培养基上划线过夜培养, 纯化后大量接种于 1/2 LB 固体培养基, 30℃ 培养至晶体产生, 油镜检验, 观察到芽胞释放量至 50% 以上 (约 45 h) 即可; 刮取培养好的菌株, 用少量无菌水悬浮于 50 mL 离心管中, 对菌落形成单位 (colony-forming units, CFU) 计数定量后备用。

1.2 LF 不同施用剂量对华北大黑鳃金龟幼虫的致病力

在六孔板各孔内放入一块新鲜马铃薯块 (0.5 cm³/块), 各孔接入 7–10 日龄健康、个体均匀的幼虫, 覆盖相对湿度为 18% 左右的无菌土 (过 40 目筛); 侵染期线虫用无菌水稀释成 100, 200, 300, 400, 500, 600 和 800 IJs/100 μL 7 个浓度, 每个浓度取 25 μL 滴加到六孔板的孔内土壤上, 盖上盖子; 每个处理设 3 组重复, 每组供试 18 头幼虫, 同时以滴加无菌水作为对照, 各处理置于 25℃ 恒温、80% 相对湿度下的人工气候箱中饲养。处理后 1, 2, 3, 4, 5, 7 和 9 d 统计幼虫死亡数, 检查时直接通过六孔板底部观察, 必要时翻动土壤, 以其体色变红并停止活动记作被线虫侵染致死; 统计死亡率。

1.3 LF 在不同温度下对华北大黑鳃金龟幼虫的致病力

在六孔板各孔内放入一块新鲜马铃薯块, 各孔接入 7–10 日龄健康、个体均匀的幼虫, 覆盖相对湿度为 18% 左右的无菌土壤; 侵染期线虫用无菌水稀释成 400 IJs/100 μL, 取 25 μL 滴加到孔内土壤上, 盖上盖子; 试验温度分别设 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33 和 40℃ 8 个恒温, 每个处理设 3 组重复, 每组 18 头供试幼虫, 同时以滴加无菌水作为对照, 各处理置于相应温度及 80% 相对湿度下的人工气候箱中饲养。检查方法同 1.2 节。

1.4 LF 在不同土壤湿度下对华北大黑鳃金龟幼虫的致病力

在六孔板各孔内放入一块新鲜马铃薯块, 各孔接入 7–10 日龄健康、个体均匀的幼虫, 灭菌土用无菌水配成土壤含水量分别为 5%, 8%, 11%, 14%, 17%, 20% 和 23% (质量浓度) 7 个湿度; 侵染期线虫用无菌水稀释成 400 IJs/100 μL, 取 25 μL 滴加到孔内土壤上, 用保鲜膜覆盖后用镊子扎一个小孔以保证一定的空气流通, 盖上盖子; 每个处理设 3 组重复, 每组 18 头供试幼虫; 同时以滴加无菌水作为对照, 各处理置于人工气候箱中 25℃ 恒温、设置的相

应湿度梯度下饲养。检查方法同 1.2 节。

1.5 Bt HBF-18 对华北大黑鳃金龟幼虫的毒力测定

将定量好的菌悬液用无菌水定容至 110 mL, 取干燥马铃薯丝 (约 30 g) 分别浸泡于菌悬液中 20 min, 然后取出土豆丝晾干, 将其混入烘干的 500 g 无菌土中, 剩余菌悬液用喷壶均匀喷入土中, 充分搅拌。将搅拌好的土样平均分到六孔板中, 以 7–10 日龄健康、个体均匀的幼虫作为供试虫, 接种于六孔板内, 每孔接虫 1 头, 每个处理接 18 头幼虫, 3 次重复, 无菌水处理作为对照。在 25℃ 恒温、80% 相对湿度的人工气候箱中饲养。处理后每隔 1 d 分别检查死亡虫数, 利用针头刺激虫体, 无任何反应的视为死亡, 反之则为存活幼虫, 统计后计算 LC₅₀ (CFU/g 土)。

1.6 Bt HBF-18 对 LF 存活的影响

依据 1.5 节中的试验结果, 将 Bt HBF-18 菌悬液稀释为 0.42×10^8 , 0.83×10^8 和 1.66×10^8 CFU/mL 3 个浓度梯度, 其分别对应 1/4 LC₅₀, 1/2 LC₅₀ 和 LC₅₀; 将线虫悬浮液加入稀释好的不同菌悬液中摇匀, 线虫终浓度均为 50 IJs/mL, 取 10 mL 混合液移入培养皿 (Φ=9 cm) 中, 用保鲜膜密封后在边缘扎些小孔, 每个处理设 3 个重复, 以无菌的清水线虫悬浮液作为对照。各处理置于 25℃ 恒温、80% 相对湿度的黑暗条件下放置 3, 6 和 9 d 后, 在显微镜下随机检查每个处理 1 mL 混合液中线虫的存活情况, 计算校正死亡率。如果 Bt 对线虫的致死作用或者亚致死效果没有超过 10%, 则展开后续实验。

判断标准参考昆虫病原线虫对药剂的 3 种不同反应类型 (Rovesti *et al.*, 1988; 魏洪义等, 1991; Ishibaahi and Takii, 1993), 即: (1) 死亡的线虫: 身体僵直或卷曲, 不活动, 对针刺无反应; (2) 亚致死状态的线虫: 身体卷曲, 由于药剂麻痹作用引起痉挛性或抽搐性活动, 对针刺无反应或反应非常迟缓; (3) 不受药剂影响的线虫: 与对照线虫一样, 身体活动舒展或静止不动, 静止的线虫经探针触碰后反应迅速。

1.7 LF 与 Bt HBF-18 混用时 Bt HBF-18 预处理最优时间筛选

用菌悬液浸泡干燥的马铃薯丝 20 min, 后取出土豆丝晾干, 将其混入烘干的无菌土中, 剩余菌悬液用喷壶均匀喷入土中, 充分搅拌, 使得 Bt 浓度为 LC₅₀, 将搅拌好的土样平均分到六孔板中, 以 7–10 日龄健康、个体均匀的幼虫作为试虫, 接种于六孔板内, 每孔接虫 1 头; 将线虫悬浮液稀释成 100 IJs/100

μL , 分别在 Bt 预处理 0, 2, 4 和 6 d 后加入线虫悬浮液 25 μL 。每个处理接 18 头幼虫, 3 次重复, 清水处理作为对照。各处理置于 25℃ 恒温、80% 相对湿度下饲养。加入线虫后 3, 5 和 7 d 分别检查幼虫的死亡数量, 利用针头刺激虫体, 无任何反应的视为死亡, 反之则为存活幼虫。

1.8 LF 与 Bt HBF-18 混用对华北黑鳃金龟幼虫防治效果的室内试验

配成 1/4 LC_{50} , 1/2 LC_{50} 和 LC_{50} 3 个 Bt 浓度梯度的带菌土; 将侵染期线虫用无菌水稀释成 100, 200 和 300 IJs/100 μL 。线虫与 Bt 进行两两组合, 各组合分别为 I (1/4 $\text{LC}_{50}\text{Bt} + 100$ IJs/100 μL LF), II (1/2 $\text{LC}_{50}\text{Bt} + 100$ IJs/100 μL LF), III ($\text{LC}_{50}\text{Bt} + 100$ IJs/100 μL LF), IV (1/4 $\text{LC}_{50}\text{Bt} + 200$ IJs/100 μL LF), V (1/2 $\text{LC}_{50}\text{Bt} + 200$ IJs/100 μL LF), VI ($\text{LC}_{50}\text{Bt} + 200$ IJs/100 μL LF), VII (1/4 $\text{LC}_{50}\text{Bt} + 300$ IJs/100 μL LF), VIII (1/2 $\text{LC}_{50}\text{Bt} + 300$ IJs/100 μL LF) 和 IX ($\text{LC}_{50}\text{Bt} + 300$ IJs/100 μL LF)。各组合均待 Bt 预处理 2 d 后加入线虫悬浮液 25 μL 。处理设置及检查方法同 1.7 节。

1.9 LF 与 Bt HBF-18 单独处理及两者混用对华北黑鳃金龟幼虫防治效果的室外盆栽试验

昆虫病原线虫单独处理: 将活力良好的侵染期线虫稀释成 500, 1 000, 1 500, 2 000, 3 000 和 4 000 IJs/mL 一系列剂量梯度, 设清水处理为对照。用铲子挖除花盆中厚度约 3 cm 的土壤, 接入幼虫, 然后覆盖 3 cm 厚的 18% 相对土壤湿度的细壤土, 在花生根基部附近加入 1 mL 线虫悬浮液。各处理均重复 3 次, 每个处理接入 15 头健康、个体均匀的 7–10 日龄供试幼虫。7 d 后统计幼虫的死亡数。

Bt 单独处理: 将 Bt 菌悬液稀释为 3.0×10^7 , 6.0×10^7 , 1.2×10^8 , 2.4×10^8 和 4.8×10^8 CFU/g 土 5 个浓度梯度, 设清水为对照; 用铲子挖除花盆中厚度约 3 cm 的土壤, 在花生根基部灌入含有相应量的 Bt 菌悬液 15 mL, 2 h 后接入幼虫, 然后覆盖 3 cm 厚的 18% 相对土壤湿度的细壤土。各处理均重复 3 次, 每个处理接入 15 头健康、个体均匀的 7–10 日龄幼虫。9 d 后统计幼虫死亡数并计算 LC_{50} 。

昆虫病原线虫与 Bt 菌的混配处理: 配制 1/4 LC_{50} , 1/2 LC_{50} 和 LC_{50} 浓度的 Bt 菌悬液。将活力良好的侵染期线虫稀释成 500, 1 000 和 1 500 IJs/mL 3 个剂量梯度, 将线虫与 Bt 两两组合, 各组合分别为 A (1/4 $\text{LC}_{50}\text{Bt} + 500$ IJs/mL LF), B (1/2 $\text{LC}_{50}\text{Bt} + 500$ IJs/mL LF), C ($\text{LC}_{50}\text{Bt} + 500$ IJs/mL LF), D (1/

4 $\text{LC}_{50}\text{Bt} + 1 000$ IJs/mL LF), E (1/2 $\text{LC}_{50}\text{Bt} + 1 000$ IJs/mL LF), F ($\text{LC}_{50}\text{Bt} + 1 000$ IJs/mL LF), G (1/4 $\text{LC}_{50}\text{Bt} + 1 500$ IJs/mL LF), H (1/2 $\text{LC}_{50}\text{Bt} + 1 500$ IJs/mL LF) 和 I ($\text{LC}_{50}\text{Bt} + 1 500$ IJs/mL LF), 设清水处理为对照。用铲子挖除花盆中厚度约 3 cm 的土壤, 在花生根基部灌入含有相应量的 Bt 菌悬液 15 mL, 2 h 后接入幼虫, 然后覆盖 3 cm 厚的 18% 相对土壤湿度的细壤土, 待 Bt 预处理 2 d 后, 在花生根基部附近加入 1 mL 线虫悬浮液。各处理均重复 3 次, 每个处理接入 15 头健康、个体均匀的 7–10 日龄供试幼虫。在加入线虫 7 d 后统计幼虫的死亡数量。

1.10 数据分析

昆虫病原线虫 LF 及 Bt 对华北黑鳃金龟幼虫的致病力、Bt 对线虫毒力均用校正死亡率 (%) 表示。百分数值均经反正弦转换后在 Excel 2003 与 SPSS 17.0 统计分析软件上完成分析。处理之间的差异采用方差分析, Duncan 氏法测验不同处理之间的差异显著性, 概率水平设 $P < 0.05$ 。毒力回归方程及致死中浓度用 Probit 模型分析。

校正死亡率 (%) =

$$\frac{\text{处理死亡率} - \text{对照死亡率}}{1 - \text{对照死亡率}} \times 100\%。$$

由 χ^2 检验判断线虫与 Bt 联合作用类型 (McVay *et al.*, 1997; Koppenhöfer and Kaya, 1997, 2002)。每个处理的供试昆虫的死亡率由死亡虫数除以处理总虫数, 并且转换为校正死亡率。线虫与 Bt 混用对供试昆虫的期望致死数 M_E 由期望致死率 $M = M_N + M_B(1 - M_N)$, 乘以供试昆虫总数计算而得, 其中 M_N 和 M_B 分别为线虫和 Bt 单独处理供试昆虫的校正死亡率。 $\chi^2 = (M_{NB} - M_E)^2 / M_E$, 其中 M_{NB} 为线虫与 Bt 混用对供试昆虫的实际校正死亡数, M_E 为线虫与 Bt 混用对供试昆虫的期望致死数。计算出的 χ^2 值与 χ^2 值表进行比较。当 $\chi^2 \geq 3.84$ ($df = 1$ 和 $P = 0.05$) 及 $M_{NB} < M_E$ 时, 显示 2 种杀虫因子混用表现为拮抗作用 (antagonism) (即 2 种杀虫因子混用后的毒力明显低于各因子毒力的总和); 当 $\chi^2 < 3.84$ ($df = 1$ 和 $P = 0.05$) 时, 显示 2 种杀虫因子混用表现为加成作用 (additivity) (即 2 种杀虫因子混用后的毒力与各因子毒力的总和相似); 当 $\chi^2 \geq 3.84$ ($df = 1$ 和 $P = 0.05$) 及 $M_{NB} > M_E$ 时, 显示 2 种杀虫因子混用表现为增效作用 (synergism) (即 2 种杀虫因子混用后的毒力明显超过各因子毒力的总和)。

2 结果

2.1 LF 不同施用剂量对华北大黑鳃金龟幼虫的致病力

表 1 表明,随 LF 处理时间增加,华北大黑鳃金龟幼虫死亡率逐渐增加;相同侵染时间下,随线虫剂量的增加,幼虫死亡率总体呈上升趋势。线虫处理 1 d 后,200 IJs/100 μL 及以上剂量处理间幼虫死亡率无显著差异 ($P > 0.05$),但 500 IJs/100 μL 及以上剂量与 100 IJs/100 μL 剂量处理间其死亡率差异

显著 ($P < 0.05$);线虫处理 2 d 后,800 IJs/100 μL 线虫剂量下幼虫的死亡率显著高于 400 IJs/100 μL 及以下剂量 ($P < 0.05$),与其他剂量处理间差异不显著 ($P > 0.05$);线虫处理 3 d 后,800 IJs/100 μL 剂量下幼虫死亡率为 66.67%,显著高于 100 和 200 IJs/100 μL 线虫剂量 ($P < 0.05$),与其他处理间差异不显著 ($P > 0.05$);线虫处理 4–9 d 后,300 IJs/100 μL 及以上线虫剂量下幼虫死亡率显著高于其他剂量处理 ($P < 0.05$);线虫处理 7 d 后,800 IJs/100 μL 剂量下幼虫死亡率达到 100% (表 1)。

表 1 昆虫病原线虫 *Heterorhabditis beicherriana* LF 品系不同施用剂量对华北大黑鳃金龟 7–10 日龄幼虫的致病力
Table 1 Pathogenicity of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis beicherriana* strain LF at different dosages to the 7–10-day-old larvae of *Holotrichia obliqua*

剂量 Dosage (IJs/100 μL)	校正死亡率 Corrected mortality rate (%)						
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	7 d	9 d
100	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 d	19.44 ± 2.78 b	33.33 ± 8.82 b	36.67 ± 6.67 c	43.33 ± 6.67 c	40.74 ± 9.80 c
200	5.73 ± 2.36 ab	10.25 ± 5.12 cd	20.43 ± 8.56 b	46.15 ± 0.00 b	61.11 ± 5.56 b	69.70 ± 3.03 b	72.70 ± 5.25 b
300	8.10 ± 4.10 ab	18.52 ± 9.70 bc	37.03 ± 3.70 ab	70.83 ± 4.17 a	85.71 ± 8.25 a	90.48 ± 9.52 a	90.48 ± 9.52 ab
400	10.46 ± 2.37 ab	19.44 ± 2.78 bc	44.44 ± 7.35 ab	77.78 ± 12.11 a	90.00 ± 10.0 a	93.33 ± 6.67 a	96.29 ± 3.70 a
500	15.23 ± 4.13 a	30.30 ± 3.03 ab	46.67 ± 3.33 ab	83.33 ± 8.82 a	92.59 ± 3.70 a	96.29 ± 3.70 a	100.00 ± 0.00 a
600	15.23 ± 4.13 a	35.87 ± 5.12 ab	50.00 ± 4.81 ab	86.67 ± 13.33 a	92.59 ± 3.70 a	96.29 ± 3.70 a	100.00 ± 0.00 a
800	15.55 ± 2.22 a	42.42 ± 3.03 a	66.67 ± 16.04 a	87.88 ± 8.02 a	95.24 ± 4.76 a	100.0 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a

表中数据为平均值 ± 标准误;同一列数据后不同字母为 Duncan 氏多重比较差异显著 ($P < 0.05$)。Data are presented as mean ± SE, and those followed by different letters in the same column are significantly different by Duncan’s multiple range test ($P < 0.05$). 表 2 和 3 同 The same for Tables 2 and 3.

2.2 LF 在不同温度下对华北大黑鳃金龟幼虫的致病力

表 2 表明,当温度为 9℃ 时,LF 处理 9 d 后华北大黑鳃金龟幼虫的死亡率仍然为零,说明此温度下 LF 对幼虫无侵染能力;13℃ 和 40℃ 下 LF 处理 3 d 时幼虫死亡率为零,可见这两个温度对 LF 的侵染力造成了显著影响;以上 3 个温度为 LF 的极不适宜温度。33℃ 和 40℃ 处理 7 d 后幼虫死亡率仅分别为 41.03% 和 5.13%,并且随处理时间的增加其死亡

率不再增加,说明 33℃ 及以上的温度限制了 LF 的侵染能力;21~29℃ 温度范围内处理 1–3 d 和 5–9 d,各温度处理间幼虫死亡率无显著差异 ($P > 0.05$),但是均显著高于 17℃ 处理时的幼虫死亡率 ($P < 0.05$);25℃ 条件下处理 4 d 后幼虫死亡率显著大于其他任何温度处理 ($P < 0.05$),处理 9 d 后幼虫死亡率达到 100%。综上所述,21~29℃ 的温度范围为 LF 侵染较适宜的环境温度,25℃ 为该病原线虫最适宜的侵染环境温度。

表 2 昆虫病原线虫 *Heterorhabditis beicherriana* LF 品系在不同温度下对华北大黑鳃金龟 7–10 日龄幼虫的致病力
Table 2 Pathogenicity of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis beicherriana* strain LF to the 7–10-day-old larvae of *Holotrichia obliqua* at different temperatures

温度 (°C) Temperature	校正死亡率 Corrected mortality rate (%)						
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	7 d	9 d
9	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 e
13	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 d	21.43 ± 2.12 d	28.57 ± 4.12 c	30.95 ± 2.38 c	35.71 ± 4.12 c
17	2.08 ± 2.08 a	4.44 ± 2.41 c	20.00 ± 6.67 bc	37.78 ± 4.44 c	53.33 ± 3.85 b	57.78 ± 5.88 b	62.22 ± 5.88 b
21	2.08 ± 2.08 a	22.22 ± 2.22 ab	35.56 ± 2.37 ab	64.44 ± 5.88 b	76.19 ± 2.38 a	85.71 ± 4.12 a	88.59 ± 2.38 a
25	4.44 ± 2.22 a	26.19 ± 6.30 a	46.15 ± 4.44 a	79.49 ± 5.13 a	87.18 ± 6.78 a	94.87 ± 2.56 a	100.00 ± 0.00 a
29	2.22 ± 2.22 a	26.19 ± 4.76 a	38.89 ± 10.20 a	63.89 ± 5.56 b	77.78 ± 7.35 a	86.11 ± 10.02 a	86.11 ± 10.02 a
33	0.00 ± 0.00 b	11.11 ± 2.09 bc	15.56 ± 2.22 c	28.21 ± 5.64 cd	38.46 ± 4.44 bc	41.03 ± 5.13 b	41.03 ± 5.13 c
40	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 d	2.38 ± 7.16 e	2.56 ± 2.41 d	5.13 ± 2.56 d	5.13 ± 2.56 d

2.3 LF 在不同土壤湿度下对华北大黑鳃金龟幼虫的致病力

表 3 表明,LF 处理 1 d 后,各土壤湿度处理间华北大黑鳃金龟幼虫的校正死亡率无显著差异 ($P>0.05$);线虫处理 2 d 后,20% 的土壤湿度下幼虫死亡率显著高于 5% 和 8% 的处理 ($P<0.05$),而与其他处理间差异不显著 ($P>0.05$);线虫处理 3–7 d 各时间段,11%~20% 的土壤湿度范围内线虫对幼虫的致病力没有明显的变化,但 5% 和 8% 土壤湿

度下线虫的致病力较弱;感染线虫 9 d,14%~20% 土壤湿度下的幼虫死亡率达到了 90% 以上,20% 处理的幼虫死亡率达到了 100%,显著高于其他土壤湿度处理造成的幼虫死亡率 ($P<0.05$);在 14%~20% 处理间幼虫死亡率差异不显著 ($P>0.05$)。由此可见,LF 侵染华北大黑鳃金龟幼虫的适宜土壤湿度范围为 14%~20%,湿度过低或过高都会显著影响这一线虫的致病力。

表 3 昆虫病原线虫 *Heterorhabditis beicherriana* LF 品系在不同土壤湿度下对华北大黑鳃金龟 7–10 日龄幼虫的致病力
Table 3 Pathogenicity of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis beicherriana* strain LF to the 7–10-day-old larvae of *Holotrichia oblitra* at different soil moisture

土壤湿度 (%) Soil moisture	校正死亡率 Corrected mortality rate (%)						
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	7 d	9 d
5	0.00±0.00 a	0.00±0.00 c	6.06±3.03 c	0.00±0.00 d	3.70±2.53 c	18.51±13.35 c	14.28±8.25 e
8	3.71±1.85 a	11.11±5.88 bc	21.43±7.14 bc	33.33±8.59 c	35.90±9.25 bc	41.02±2.56 b	48.72±2.57 d
11	5.56±0.00 a	18.75±3.61 abc	42.22±2.22 ab	61.50±4.44 abc	69.23±4.44 a	76.92±0.00 a	79.49±2.57 c
14	3.70±1.85 a	20.37±1.85 abc	47.92±9.08 a	68.89±2.22 ab	75.55±2.22 a	82.22±2.22 a	93.33±3.84 ab
17	5.56±0.00 a	37.03±8.07 ab	58.82±3.40 a	72.92±4.17 ab	83.33±9.08 a	89.58±2.08 a	93.75±0.00 ab
20	7.41±3.70 a	43.75±15.73 a	68.75±6.25 a	88.89±5.88 a	88.89±5.88 a	88.89±5.87 a	100.00±0.00 a
23	3.71±1.85 a	18.52±1.85 abc	44.44±3.21 ab	49.02±8.55 bc	58.33±8.33 ab	79.16±4.17 a	81.25±3.61 bc

2.4 Bt HBF-18 对华北大黑鳃金龟幼虫的毒力

Bt HBF-18 对华北大黑鳃金龟幼虫的毒力随处理时间的增加逐渐增强,随 Bt 浓度的增大毒力逐渐增强,其中 2.35×10^8 , 4.7×10^8 , 9.4×10^8 , 1.88×10^9 和 3.75×10^9 CFU/g 土的 Bt 浓度处理后 9 d 的死亡率分别是 61.75%, 69.94%, 72.68%, 75.41% 和 86.34%;各浓度处理后 10 d 死亡率较处理后 9 d 均不再增加(图 1)。由表 4 可见,处理后 9 d,Bt HBF-18 对华北大黑鳃金龟幼虫的致死中浓度 (LC_{50}) 为 1.44×10^8 CFU/g 土,相关系数为 0.958。

2.5 Bt HBF-18 对 LF 存活的影响

不同 Bt 浓度处理 3, 5, 7 和 9 d 后,均无亚致死状态的 LF 线虫出现。各浓度处理相同时间之间差异不显著 ($P>0.05$),并且对 LF 的致死作用都没有超 10%(图 2)。由此可见,Bt HBF-18 对 LF 的存活基本没有影响。

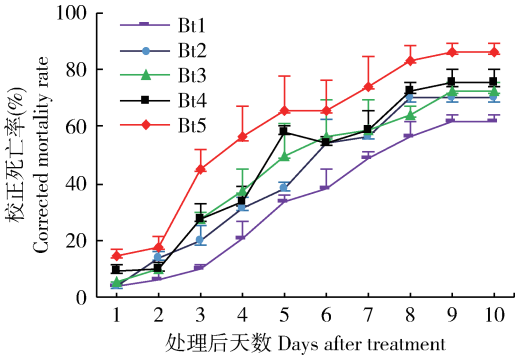


图 1 不同浓度 Bt HBF-18 处理后华北大黑鳃金龟 7–10 日龄幼虫的校正死亡率

Fig. 1 The corrected mortality of the 7–10-day-old larvae of *Holotrichia oblitra* after treatment with different concentrations of Bt HBF-18

Bt1–Bt5: Bt 浓度分别为 2.35×10^8 , 4.7×10^8 , 9.4×10^8 , 1.88×10^9 和 3.75×10^9 CFU/g 土 Bt concentrations 2.35×10^8 , 4.7×10^8 , 9.4×10^8 , 1.88×10^9 and 3.75×10^9 CFU/g soil, respectively.

表 4 Bt HBF-18 处理 9 d 对华北大黑鳃金龟 7–10 日龄幼虫的毒力
Table 4 Toxicity of Bt HBF-18 to the 7–10-day-old larvae of *Holotrichia oblitra* after treatment for 9 d

菌株 Isolate	回归方程 Regression equation	LC_{50} (CFU/g soil)	95% 置信限 (CFU/g soil) 95% confidence limit	相关系数 Correlation coefficient
Bt HBF-18	$y = -0.099 + 0.622x$	1.44×10^8	$0.2 \times 10^7 - 3.9 \times 10^8$	0.958

2.6 Bt 和 LF 两者混用时 Bt HBF-18 预处理最优时间筛选

由图 3 可知,应用 Bt 预处理 0 d ($M_E = 34.87$;

$M_{NB} = 35.66$; $\chi^2 = 0.02 < 3.84$), 2 d ($M_E = 38.96$; $M_{NB} = 52.85$; $\chi^2 = 4.95 > 3.84$), 4 d ($M_E = 40.72$; $M_{NB} = 49.42$; $\chi^2 = 1.85 < 3.84$) 和 6 d ($M_E = 41.44$;

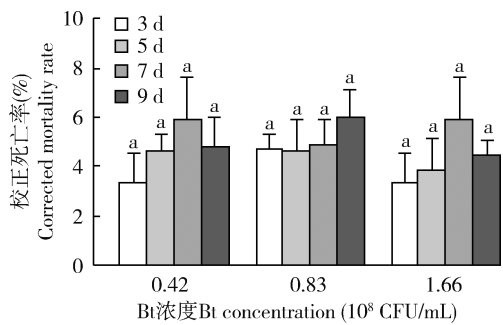


图2 不同浓度 Bt HBF-18 处理不同时间后昆虫病原线虫 *Heterorhabditis beicherriana* LF 品系的校正死亡率

Fig. 2 The corrected mortality rate of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis beicherriana* strain LF after treatment with different concentrations of Bt HBF-18 for different time

柱上相同小写字母表示 Duncan 氏多重比较差异不显著 ($P > 0.05$)。The same lowercase letters above bars indicate no significant difference by Duncan's multiple range test ($P > 0.05$) .

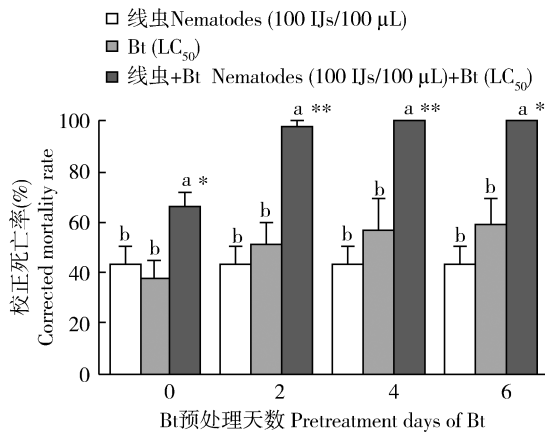


图3 Bt HBF-18 预处理不同天数后与昆虫病原线虫 *Heterorhabditis beicherriana* LF 品系混用对华北大黑鳃金龟 7-10 日龄幼虫的致病力

Fig. 3 The pathogenicity of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis beicherriana* strain LF to the 7-10-day-old larvae of *Holotrichia obliqua* after pretreatment with Bt HBF-18 for different days

柱上星号表示线虫与 Bt 混用具有加成作用,双星号表示线虫与 Bt 混用具有协同增效作用。The additive effect between nematodes and Bt is indicated by the asterisk, and the synergism effect between nematodes and Bt is indicated by double asterisk.

$M_{NB} = 51.71$; $\chi^2 = 2.54 < 3.84$) 后再施用 LF 对华北大黑鳃金龟幼虫的防治效果具有加成作用,并且两者混用的防治效果显著高于单独的线虫或 Bt 处理 ($P < 0.05$) 的效果,其中应用 Bt 预处理 2 d ($M_E = 38.96$; $M_{NB} = 52.85$; $\chi^2 = 4.95 > 3.84$) 和 4 d ($M_E =$

40.72; $M_{NB} = 54$; $\chi^2 = 4.33 > 3.84$) 后与昆虫病原线虫 LF 混用均具有协同增效作用。预处理 2 d 增效趋势较明显且防治效果已接近最佳,故后期相关实验均采用 Bt 预处理 2 d。

2.7 LF 与 Bt HBF-18 混用对华北大黑鳃金龟幼虫的防治效果

LF 与 Bt HBF-18 混用的所有组合对华北大黑鳃金龟幼虫的防效均表现出加成($\chi^2 < 3.84$)或协同增效($\chi^2 \geq 3.84$ 且 $M_{NB} > M_E$)作用(表 5)。组合 I 中随处理时间的增加,混用处理与单独 Bt 或单独线虫处理间差异显著 ($P < 0.05$),而混用处理不同时间之间也存在显著差异 ($P < 0.05$),处理 7 d 的幼虫死亡率显著大于处理 3 d 和 5 d ($P < 0.05$),并且混用处理 7 d 具有协同增效作用 ($M_E = 36.86$; $M_{NB} = 49.26$; $\chi^2 = 4.17$),较单独线虫和 Bt 处理死亡率分别提高了约 47.90% 和 57.47%;组合 II 混用处理不同时间均表现为加成作用;组合 III 中,混用处理的幼虫死亡率显著大于单独的线虫或 Bt 处理 ($P < 0.05$),混用处理 5 d 与 7 d 无显著差异 ($P > 0.05$),但显著好于处理 3 d ($P < 0.05$),其中混用处理 5 d 具有明显的协同增效作用 ($M_E = 36.12$; $M_{NB} = 49.38$; $\chi^2 = 4.87$);组合 IV 中,混用处理 3 d 表现为增效作用;组合 V~IX 中,混用处理 5-7 d 差异不显著 ($P > 0.05$)。其中组合 V 中混用处理均表现为加成作用;组合 VI 中混用处理 3 d 的表现为增效作用,5 d 和 7 d 为加成作用;组合 VII 中混用处理均表现为加成作用;组合 VIII~IX 只有混用处理 3 d 时表现为协同增效作用(表 5)。综上所述,将 LF 与 Bt HBF-18 混用对华北大黑鳃金龟幼虫的防效具有加成或协同增效作用。

2.8 LF 与 Bt HBF-18 单独处理及两者混用对华北大黑鳃金龟幼虫防治效果的室外盆栽实验

由图 4 可知,盆栽实验中单独 LF 处理随施用剂量的增加,华北大黑鳃金龟幼虫死亡率也逐渐增加,当线虫剂量为 500 IJs/mL 时,死亡率仅为 2.78%,1 000 IJs/mL 的线虫剂量下幼虫的死亡率为 20% 左右;当线虫剂量达到 3 000 IJs/mL 时死亡率达到 90% 以上,并显著高于 1 000 和 2 000 IJs/mL 剂量的死亡率;但剂量再增加时死亡率呈缓慢增加 ($P > 0.05$)。

表 6 表明,盆栽实验中 Bt 对华北大黑鳃金龟幼虫的致死中浓度为 1.22×10^8 CFU/g 土,相关系数为 0.989。

表 5 昆虫病原线虫 *Heterorhabditis beicherriana* LF 品系与 Bt HBF-18 混用
对华北大黑鳃金龟 7–10 日龄幼虫的防治效果

Table 5 Bioefficacy of the combined application of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis beicherriana* strain LF and Bt HBF-18 against the 7–10-day-old larvae of *Holotrichia oblit*a

组合 Combination	处理时间 (d) Treatment time	D _N (%)	D _B (%)	D _{NB} (%)	M _E	M _{NB}	χ ²	作用类型 Effect
I (1/4 LC ₅₀ Bt + 100 IJs/100 μL LF)	3	19.44 ± 2.78 abB	9.80 ± 1.96 bC	21.68 ± 3.48 aC	14.76	11.70	0.63	加成 Additivity
	5	36.67 ± 6.67 bA	20.83 ± 5.51 cB	57.27 ± 4.23 aB	28.86	30.93	0.15	加成 Additivity
	7	43.33 ± 6.67 bA	33.76 ± 2.14 bA	91.23 ± 2.19 aA	36.86	49.26	4.17	增效 Synergism
II (1/2 LC ₅₀ Bt + 100 IJs/100 μL LF)	3	19.44 ± 2.78 bB	19.61 ± 5.20 bC	49.80 ± 2.01 aC	19.03	26.89	3.25	加成 Additivity
	5	36.67 ± 6.67 bA	31.25 ± 3.61 bB	80.77 ± 3.70 aB	34.30	43.62	2.53	加成 Additivity
	7	43.33 ± 6.67 bA	38.03 ± 2.14 bA	97.81 ± 2.19 aA	41.31	52.82	3.20	加成 Additivity
III (LC ₅₀ Bt + 100 IJs/100 μL LF)	3	19.44 ± 2.78 bB	27.45 ± 1.96 bC	57.83 ± 3.48 aB	22.43	31.22	3.44	加成 Additivity
	5	36.67 ± 6.67 bA	37.50 ± 7.22 bB	91.45 ± 2.14 aA	36.12	49.38	4.87	增效 Synergism
	7	43.33 ± 6.67 bA	50.0 ± 10.83 bA	95.61 ± 2.19 aA	45.15	51.63	0.93	加成 Additivity
IV (1/4 LC ₅₀ Bt + 200 IJs/100 μL LF)	3	20.43 ± 8.56 bB	9.80 ± 1.96 bcC	39.76 ± 3.48 aC	13.71	21.04	4.38	增效 Synergism
	5	61.11 ± 5.56 bA	20.83 ± 5.51 cB	78.63 ± 4.23 aB	41.95	42.46	0.01	加成 Additivity
	7	69.70 ± 3.03 bA	33.76 ± 2.14 cA	100.00 ± 0.00 aA	50.94	54.00	0.18	加成 Additivity
V (1/2 LC ₅₀ Bt + 200 IJs/100 μL LF)	3	20.43 ± 8.56 bB	19.61 ± 5.19 bC	49.80 ± 4.02 aB	19.46	26.89	2.84	加成 Additivity
	5	61.11 ± 5.56 bA	31.25 ± 3.61 cB	100.00 ± 0.00 aA	47.32	54.00	0.94	加成 Additivity
	7	69.70 ± 3.03 aA	38.03 ± 2.14 bA	100.00 ± 0.00 aA	55.33	54.00	0.03	加成 Additivity
VI (LC ₅₀ Bt + 200 IJs/100 μL LF)	3	20.43 ± 8.56 bB	27.45 ± 1.96 bC	63.85 ± 3.48 aB	22.83	34.48	5.95	增效 Synergism
	5	61.11 ± 5.56 bA	37.50 ± 7.22 cB	100.00 ± 0.00 aA	49.11	54.00	0.49	加成 Additivity
	7	69.70 ± 3.03 bA	50.85 ± 10.8 cA	100.00 ± 0.00 aA	59.12	54.00	0.44	加成 Additivity
VII (1/4 LC ₅₀ Bt + 300 IJs/100 μL LF)	3	37.03 ± 3.70 bB	9.80 ± 1.96 cC	55.82 ± 4.02 aB	23.33	30.14	2.00	加成 Additivity
	5	85.71 ± 8.25 bA	20.83 ± 5.51 cB	100.00 ± 0.00 aA	53.37	54.00	0.01	加成 Additivity
	7	90.48 ± 9.52 bA	33.76 ± 2.14 cA	100.00 ± 0.00 aA	59.38	54.00	0.49	加成 Additivity
VIII (1/2 LC ₅₀ Bt + 300 IJs/100 μL LF)	3	37.03 ± 3.70 bB	19.61 ± 5.19 cC	69.88 ± 3.47 aB	26.66	37.74	4.60	增效 Synergism
	5	85.71 ± 8.25 bA	31.25 ± 3.61 cB	100.00 ± 3.70 aA	56.91	54.00	0.23	加成 Additivity
	7	90.48 ± 9.52 aA	38.03 ± 2.14 bA	100.00 ± 0.00 aA	62.86	54.00	1.25	加成 Additivity
IX (LC ₅₀ Bt + 300 IJs/100 μL LF)	3	37.03 ± 3.70 bB	27.45 ± 1.96 cC	73.90 ± 2.01 aB	29.33	39.91	3.85	增效 Synergism
	5	85.71 ± 8.25 bA	37.50 ± 7.22 cB	100.00 ± 0.00 aA	59.03	54.00	0.43	加成 Additivity
	7	90.48 ± 9.52 aA	50.85 ± 10.8 bA	100.00 ± 0.00 aA	65.86	54.00	2.14	加成 Additivity

D_N, D_B, D_{NB} 分别表示线虫、Bt、线虫 + Bt 混用下蛴螬的校正死亡率 Corrected mortality rate of grub treated with nematodes, Bt and nematodes + Bt, respectively. M_E, M_{NB}: 分别表示线虫与 Bt 混用后期望致死数、混用后实际校正死亡数 Expected lethal number and the actual corrected number of death individuals after treatment with nematodes + Bt, respectively. 同行数据后不同小写字母表示差异显著 (Duncan 氏多重比较, $P < 0.05$); 各组合中同列数据后的不同大写字母表示差异显著 (Duncan 氏多重比较, $P < 0.05$)。Different lowercase letters following the data in the same row indicate significant difference (Duncan's multiple range test, $P < 0.05$), while different uppercase letters after the data in each combination in each column indicate significant difference (Duncan's multiple range test, $P < 0.05$). 表 7 同 The same for Table 7.

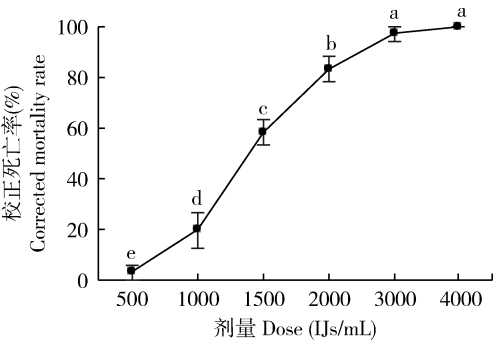


图 4 室外盆栽实验中昆虫病原线虫 *Heterorhabditis beicherriana* LF 品系对华北大黑鳃金龟 7–10 日龄幼虫的致病力

Fig. 4 Pathogenicity of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis beicherriana* LF to the 7–10-day-old larvae of *Holotrichia oblit*a in the outdoor pot experiment

表 7 表明,组合 A–C 混用处理与单独 Bt 处理之间差异不显著 ($P > 0.05$),组合 B 和 C 中混用处理的幼虫死亡率显著高于单独的 LF 处理;组合 D–I 中混用处理的死亡率显著高于单独的线虫及 Bt 处理 ($P < 0.05$)。在组合 H 和 I 中的混用处理效果显著高于其他组合的混用处理 ($P < 0.05$);所有组合均表现出不同程度的加成或协同增效作用,其中组合 E, F 和 H 具有协同增效作用,组合 H 增效作用最明显 ($M_E = 37.17$; $M_{NB} = 52.50$; $\chi^2 = 6.32$),较单独线虫和 Bt 处理分别提高了约 38.89% 和 80.55%。组合 F 次之 ($M_E = 29.60$; $M_{NB} = 42.00$; $\chi^2 = 5.20$),较单独线虫和 Bt 处理幼虫死亡率分别提高了约 58.34% 和 33.34%。综上所述,盆栽实验

表 6 室外盆栽实验中 Bt HBF-18 对华北大黑鳃金龟 7-10 日龄幼虫的毒力

Table 6 Toxicity of Bt HBF-18 to the 7-10-day-old larvae of <i>Holotrichia oblita</i> in the outdoor pot experiment				
菌株 Isolate	回归方程 Regression equation	LC ₅₀ (CFU/g soil)	95% 置信限 (CFU/g soil) 95% confidence limit	相关系数 Correlation coefficient
Bt HBF-18	$y = -4.143 + 3.813x$	1.22×10^8	$9.34 \times 10^7 - 1.47 \times 10^8$	0.989

表 7 盆栽实验中昆虫病原线虫 *Heterorhabditis beicherriana* LF 品系与 Bt HBF-18 混用
对华北大黑鳃金龟 7-10 日龄幼虫的防治效果

Table 7 Bioefficacy of the combined application of the entomopathogenic nematode <i>Heterorhabditis beicherriana</i> strain LF and Bt HBF-18 against the 7-10-day-old larvae of <i>Holotrichia oblita</i> in the pot experiment								
组合 Combination	D _N (%)	D _B (%)	D _{NB} (%)	M _E	M _{NB}	χ ²	作用类型 Effect	
A (1/4 LC ₅₀ Bt + 500 IJs/mL LF)	2.78 ± 2.78 aC	5.56 ± 7.34 aC	5.56 ± 2.78 aE	3.92	3.00	0.21	加成 Additivity	
B (1/2 LC ₅₀ Bt + 500 IJs/mL LF)	2.78 ± 2.78 bC	16.67 ± 4.81 aB	22.22 ± 5.56 aD	8.75	12.00	1.21	加成 Additivity	
C (LC ₅₀ Bt + 500 IJs/mL LF)	2.78 ± 2.78 bC	44.44 ± 7.35 aA	50.00 ± 4.81 aC	20.83	27.00	1.82	加成 Additivity	
D (1/4 LC ₅₀ Bt + 1 000 IJs/mL LF)	19.44 ± 7.35 bB	5.56 ± 7.34 bC	27.78 ± 7.34 aD	12.89	15.00	0.35	加成 Additivity	
E (1/2 LC ₅₀ Bt + 1 000 IJs/mL LF)	19.44 ± 7.35 bB	16.67 ± 4.81 bB	50.00 ± 4.81 aC	17.66	27.00	4.93	增效 Synergism	
F (LC ₅₀ Bt + 1 000 IJs/mL LF)	19.44 ± 7.35 cB	44.44 ± 7.35 bA	77.78 ± 2.78 aB	29.60	42.00	5.20	增效 Synergism	
G (1/4 LC ₅₀ Bt + 1 500 IJs/mL LF)	58.33 ± 4.81 bA	5.56 ± 7.34 cC	75.00 ± 4.81 aB	33.39	40.50	1.51	加成 Additivity	
H (1/2 LC ₅₀ Bt + 1 500 IJs/mL)	58.33 ± 4.81 bA	16.67 ± 4.81 cB	97.22 ± 2.78 aA	37.17	52.50	6.32	增效 Synergism	
I (LC ₅₀ Bt + 1 500 IJs/mL LF)	58.33 ± 4.81 bA	44.44 ± 7.35 cA	100.00 ± 0.00 aA	46.61	54.00	1.17	加成 Additivity	

中将 LF 与 Bt HBF-18 混用对华北大黑鳃金龟幼虫的防控也具有加成或协同增效作用,但低剂量的 LF (500 IJs/mL) 与不同浓度的 Bt HBF-18 混用时仅表现为加成作用。

3 讨论

昆虫病原线虫离开寄主昆虫后在土壤中存活期的长短及其侵染能力主要取决于土壤温度、湿度和土壤类型等(Shapiro-Ilan *et al.*, 2006)。温度太高,不利于 EPNs 存活;温度太低,EPNs 活动能力降低。有研究表明,当砂土含水量为 5% ~ 15% (w/w) 时 *Steinernema carpocapsae* Ohio 线虫的杀虫活性最高,随湿度降低,杀虫活性明显降低(余向阳等, 2003)。另有调查表明,在松沙土中有线虫的概率为 20.8%,中壤土中为 12.2%,而轻壤土中却只有 5.4%(李晓巍等, 1995; 王慧等, 1998; 朱建华, 2002)。本研究结果(表 3)也表明,昆虫病原线虫 LF 在土壤湿度为 14% ~ 20% 时侵染力较强,华北大黑鳃金龟幼虫死亡率可达到 90% 以上的,而湿度过低(5% 及以下)或过高(23% 及以上)都会显著影响 LF 的致病力。

研究表明,在最佳环境条件下,昆虫病原线虫 LF 单独处理 7 d 后华北大黑鳃金龟幼虫的死亡率达到了 100%(表 1),表明昆虫病原线虫 LF 具有较

高的室内杀虫活性,但是速效性较差,与钱秀娟等(2015)利用 *Heterorhabditis megidis* 0627M 品系测定其对华北大黑鳃金龟幼虫致病力的研究结果一致。单独施用 Bt HBF-18 菌株对华北大黑鳃金龟幼虫的室内毒力测定结果表明,处理 10 d,高浓度的 Bt 杀虫效果也仅为 86.34% (图 1),说明其致病力较弱且速效性差。另有研究表明,随着 Bt 制剂持续使用以及转 Bt 作物的广泛种植导致了靶标害虫的中肠蛋白酶缺失、酯酶整合及免疫反应增强、Bt 毒素结合位点改变等(Ferré and Van Rie, 2002; Gunning *et al.*, 2005; Rahman *et al.*, 2007),从而使靶标害虫对 Bt 产生了抗性。例如印度田间的红铃虫 *Pectinophora gossypiella* 对 Cry1Ac 产生了抗性,巴西秋粘虫 *Spodoptera frugiperda* 在田间对 Cry1Ab 产生了抗性等(Tabashnik, 2010; Omoto *et al.*, 2015)。而我们将昆虫病原线虫 LF 和 Bt HBF-18 混用的研究表明,所有的线虫和 Bt 的组合都具有不同程度的加成或协同增效作用,盆栽实验中组合 H (1/2 LC₅₀ Bt + 1 500 IJs/mL LF) 致使华北大黑鳃金龟幼虫死亡率达到 97% 以上,与单独线虫 3 000 IJs/mL 以上剂量处理死亡率相当,此组合增效作用明显,较单独线虫和 Bt 处理幼虫死亡率分别提高了约 38.89% 和 80.55% (表 7),表明 LF 和 Bt HBF-18 混合施用防治华北大黑鳃金龟幼虫可以减少 50% 昆虫病原线虫和 Bt 的使用剂量,提高速效性,为延缓

日益严重的害虫抗药性问题提供了新的思路与途径。

昆虫病原线虫与 Bt 混用产生加成或增效的原因可能与蛴螬对外来入侵的防御机制有关。蛴螬的防御机制主要有行为防御和生理防御,行为机制是通过摩擦表皮或清理口器以清理掉附在其表皮或口器上的线虫(Gaugler *et al.*, 1994),生理防御是蛴螬的体液使侵入的线虫包裹化,从而杀死线虫或使侵入其体内的线虫失去杀虫活性(Wang *et al.*, 1995)。已有研究表明,Bt HBF-18 可以引起蛴螬中肠肠壁细胞排列疏松,细胞空洞化等病变(王小奇等, 2016),降低了蛴螬对线虫的抵御能力,方便线虫侵入及其共生菌在体内的繁殖;另外线虫会对寄主体内的 CO₂ 浓度、分泌物等产生敏感反应(杨秀芬和杨怀文, 1998),而经 Bt 处理后势必会引起蛴螬代谢活动的变化(谭树乾, 2013),间接提高了线虫的侵入机率,以上因素都可能是两者混用产生加成或增效效果的原因。

针对盆栽试验中低剂量 LF 与 Bt HBF-18 混用或者低浓度 Bt HBF-18 与 LF 混用(1/4 LC₅₀Bt + 500 IJs/mL LF, 1/2 LC₅₀Bt + 500 IJs/mL LF, LC₅₀ Bt + 500 IJs/mL LF, 1/4 LC₅₀Bt + 1 000 IJs/mL LF, 1/4 LC₅₀ Bt + 1 500 IJs/mL LF)仅表现为加成作用(表 7),分析其原因可能是线虫受外界环境不良因素的影响致使其自身存活率不足,另外此浓度下 Bt 对蛴螬毒力较小,基本上没有影响蛴螬的正常活动所致。在今后研究中将从组织病理学及体内相关酶活性变化的角度展开深入研究病原线虫与 Bt 混用的机理,并进一步验证联合施用对华北大黑鳃金龟幼虫的田间防效。此外还需通过进一步的试验证实昆虫病原线虫 LF 与 Bt HBF-18 混用对其他蛴螬类地下害虫的作用效果,以便满足农作物生产上防治蛴螬类地下害虫的实际需求。

参考文献 (References)

Boemare NE, Ahkurst RJ, Mourant RG, 1993. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43(2): 244 – 255.

Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, Soberón M, 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 41(7): 423 – 431.

Ferré J, Van Rie J, 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.*, 47: 501 – 533.

Gaugler R, 2002. *Entomopathogenic Nematodes*. CABI Publishing,

Wallingford, UK. 115 – 144.

Gaugler R, Wang YI, Campbell JF, 1994. Aggressive and evasive behaviors in *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae: defense against entomopathogenic nematode attack. *J. Invertebr. Pathol.*, 64: 193 – 199.

Georgis R, Gaugler R, 1991. Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes. *J. Econ. Entomol.*, 84(3): 713 – 720.

Gunning RV, Dang HT, Kemp FC, Nicholson IC, Moores GD, 2005. New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(5): 2558 – 2563.

Guo W, Yan X, Zhao G, Han R, 2013. Efficacy of entomopathogenic *Steinernema* and *Heterorhabditis* nematodes against white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) in peanut fields. *J. Econ. Entomol.*, 106(3): 1112 – 1117.

Guo WX, Yan X, Zhao GY, Chen JH, Han R, 2015. Efficacy of entomopathogenic *Steinernema* and *Heterorhabditis* nematodes against *Holotrichia oblita*. *J. Pest Sci.*, 88(2): 359 – 368.

Huang Y, 2017. The Effect of Grubs Environment in Vivo on the Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis*. MSc Thesis, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing. [黄颖, 2017. 蛴螬体内环境对 Bt 杀虫活性的影响. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文]

Ishibaahi N, Takii SJ, 1993. Effects of insecticides on movement, nictation, and infectivity of *Steinernema carpocapsae*. *J. Nematol.*, 25(2): 204 – 213.

Jouzani GS, Valijanani E, Sharafi R, 2017. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 101(7): 2691 – 2711.

Kirouac M, Vachon V, Noël J-F, Girard F, Schwartz J-F, Laprade L, 2002. Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 1561(2): 171 – 179.

Klein MG, 1993. Biological control of scarabs with entomopathogenic nematodes. In: Bedding R, Akhurst R, Kaya H eds. *Nematodes and the Biological Control of Insect Pests*. CSIRO Press, East Melbourne, Australia. 49 – 58.

Koppenhöfer AM, Cowles RS, Cowles EA, Baumgartner L, 2002. Comparison of neonicotinoid insecticides as synergists for entomopathogenic nematodes. *Biol. Control*, 24(1): 90 – 97.

Koppenhöfer AM, Fuzy EM, 2003. *Steinernema scarabaei* for the control of white grubs. *Biol. Control*, 28(1): 47 – 59.

Koppenhöfer AM, Kaya HK, 1997. Additive and synergistic interaction between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* for scarab grub control. *Biol. Control*, 8: 131 – 137.

Li HP, Han RC, 2007. Advances in the researches on the infective behaviors of entomopathogenic nematodes. *Chin. Bull. Entomol.*, 44(5): 637 – 642. [李慧萍, 韩日畴, 2007. 昆虫病原线虫感染寄主行为研究进展. 昆虫知识, 44(5): 637 – 642]

Li XW, Mei SL, Wu HY, Huo YB, Song JZ, Xi JH, Xu SF, Zhao KJ,

- Li GX, 1995. On the application of an entomogenous nematode against larger black cockchafer in beet fields. *Plant Prot.*, 21(4): 14–16. [李晓巍, 梅树林, 武鸿燕, 霍云波, 宋金柱, 席景会, 许少甫, 赵奎军, 李国勋, 1995. 昆虫病原线虫防治甜菜地蛴螬的初步研究. 植物保护, 21(4): 14–16]
- Liu SS, Li KB, Liu CQ, Wang QL, Yin J, Cao YZ, 2010. Virulence of *Heterorhabditis bacteriophora* strain Cangzhou to larvae of *Holotrichia parallela*. *Plant Prot.*, 36(5): 96–100. [刘树森, 李克斌, 刘春琴, 王庆雷, 尹姣, 曹雅忠, 2010. 嗜菌异小杆线虫沧州品系对暗黑鳃金龟幼虫的致病力. 植物保护, 36(5): 96–100]
- Liu SS, Li KB, Yin J, Cao YZ, 2008. Review of the researches on biological control of grubs. *Chin. J. Biol. Control*, 24(2): 168–173. [刘树森, 李克斌, 尹姣, 曹雅忠, 2008. 蛴螬生物防治研究进展. 中国生物防治, 24(2): 168–173]
- Malan AP, Konetse R, Moore SD, 2011. Isolation and identification of entomopathogenic nematodes from citrus orchards in South Africa and their biocontrol potential against false codling moth. *J. Invertebr. Pathol.*, 108(2): 115–125.
- McVay JR, Gudauskas RT, Harper JD, 1997. Effects of *Bacillus thuringiensis* nuclear-polyhedrosis virus mixtures on *Trichoplusia ni* larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 29: 367–372.
- Omoto C, Bernardi O, Salmeron E, Sorgatto RJ, Dourado PM, Crivellari A, Carvalho RA, Willse A, Martinelli S, Head GP, 2015. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. *Pest Manag. Sci.*, 72(9): 1727–1736.
- Pei GY, Ma SF, Liu J, Liu BC, 2010. Effects of different cultivation patterns on grubs occurrence and yield in soybean fields. *Soybean Bull.*, (4): 19–20. [裴桂英, 马赛飞, 刘健, 刘保才, 2010. 不同耕作模式对豆田蛴螬发生及大豆产量的影响. 大豆科技, (4): 19–20]
- Poinar GO, 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: Gaugler R, Kaya HK eds. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press Inc., Boca Raton, FL. 23–61.
- Qian XJ, Liu CZ, Ruan YE, 2015. Pathogenicity of entomopathogenic nematodes to grass grubs (Coleoptera: Scarabaeidae). *Acta Agrest. Sin.*, 23(2): 414–421. [钱秀娟, 刘长仲, 阮艳娥, 2015. 昆虫病原线虫对甘肃省草地蛴螬的致病力研究. 草地学报, 23(2): 414–421]
- Rahman MM, Roberts HLS, Schmidt O, 2007. Tolerance to *Bacillus thuringiensis* endotoxin in immune-suppressed larvae of the flour moth *Ephestia kuehniella*. *J. Invertebr. Pathol.*, 96(2): 125–132.
- Rovesti L, Heinzpeter EW, Tagliente F, Deseò KV, 1988. Compatibility of pesticide with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Nematode: Heterorhabditidae). *Nematologica*, 34: 462–476.
- Shapiro-Ilan DI, Gouge DH, Koppenhöfer AM, 2002. Factors affecting commercial success: case studies in cotton, turf and citrus. In: Gaugler R ed. Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing, Wallingford, UK. 333–356.
- Shapiro-Ilan DI, Gough DH, Piggott SJ, Patterson JF, 2006. Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Biol. Control*, 38(1): 124–133.
- Shu C, Yan G, Wang R, Zhang J, Feng S, Huang D, Song F, 2009. Characterization of a novel *cry8* gene specific to Melolonthidae pests: *Holotrichia obliqua* and *Holotrichia parallela*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84(4): 701–707.
- Tabashnik BE, 2010. Communal benefits of transgenic corn. *Science*, 330(6001): 189–190.
- Tan SQ, 2013. Physiological and Biochemical Mechanisms of Cry8Gα1 and Cry8Eα1 Protein Poisoning to Grubs. MSc Thesis, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi. [谭树乾, 2013. Cry8Gα1 和 Cry8Eα1 蛋白毒杀蛴螬的生理生化机制研究. 陕西杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文]
- Vachon V, Laprade R, Schwartz J-L, 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *J. Invertebr. Pathol.*, 111(1): 1–12.
- Wang H, Zeng YQ, Li TJ, Song XG, 1998. Study on the application of entomopathogenic nematodes to control *Musca domestica*. *Shandong Anim. Husband. Vet.*, (1): 3–4. [王慧, 曾勇庆, 李铁坚, 宋希阁, 1998. 应用昆虫病原线虫防治鸡场家蝇蛆的研究. 山东畜牧兽医, (1): 3–4]
- Wang XQ, Shu CL, Jiang J, Zhang FJ, Liu CQ, Zhang J, 2016. Screening and identification of *cry* genes from *Bacillus thuringiensis* isolates highly toxic to the larvae of *Holotrichia obliqua*. *J. Plant Prot.*, 43(3): 483–492. [王小奇, 束长龙, 蒋健, 张风娇, 刘春琴, 张杰, 2016. 对大黑鳃金龟甲幼虫高效的苏云金芽胞杆菌筛选及 *cry* 基因鉴定. 植物保护学报, 43(3): 483–492]
- Wang Y, Campbell JF, Gaugler R, 1995. Infection of entomopathogenic nematodes *Steinernema glaseri* and *Heterorhabditis bacteriophora* against *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 66: 178–184.
- Wei HY, Wang GH, Pang XF, 1991. The virulence of several insecticides against the Steinernematidae. *Nat. Enem. Insects*, 13(2): 92–95. [魏洪义, 王国汉, 庞雄飞, 1991. 几种杀虫剂对斯氏线虫的毒力. 昆虫天敌, 13(2): 92–95]
- White GF, 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science*, 66(1709): 302–303.
- Wu WD, Sun HY, Xi JH, Yin J, Zhang S, Cao YZ, Li KB, Xiao C, 2015. Observations of the ultrastructure of the fat body and midgut tissues of two white grub species, *Holotrichia parallela* and *H. obliqua* (Coleoptera: Melolonthidae), infected by entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Acta Entomol. Sin.*, 58(8): 836–845. [吴文丹, 孙昊雨, 席景会, 尹姣, 张帅, 曹雅忠, 李克斌, 肖春, 2015. 嗜菌异小杆线虫侵染后暗黑鳃金龟和大黑鳃金龟幼虫脂肪体和中肠组织超微结构观察. 昆虫学报, 58(8): 836–845]
- Yan X, Guo WX, Zhao GY, Han RC, 2014. Research advances in subterranean pest control by entomopathogenic nematodes. *J. Environ. Entomol.*, 36(6): 1018–1024. [颜珣, 郭文秀, 赵国玉, 韩日畴, 2014. 昆虫病原线虫防治地下害虫的研究进展. 环境昆虫学报, 36(6): 1018–1024]
- Yang XF, Yang HW, 1998. The pathogenic mechanism of

entomopathogenic nematodes. *Chin. J. Biol. Control*, 14 (4): 38 – 42. [杨秀芬, 杨怀文, 1998. 昆虫病原线虫的致病机理. 中国生物防治, 14(4): 38 – 42]

Yu XY, Tu DL, Liu JN, Xie P, Lu ZH, Liu XJ, 2003. Infectivity of *Steinernema carpocapsae* Ohio to some insect pests and influence of temperature and humidity under laboratory condition. *Jiangsu J. Agric. Sci.*, 19(1): 13 – 17. [余向阳, 土冬兰, 刘济宁, 解平, 卢子华, 刘贤近, 2003. 昆虫病原线虫的室内感染活性及其所受温湿度的影响. 江苏农业学报, 19(1): 13 – 17]

Zhang MC, Yin J, Li KB, Cao YZ, Wu JX, 2014. Research progress on the occurrences of white grub and its control. *Chin. Plant Prot.*, 34 (10): 20 – 28. [张美翠, 尹姣, 李克斌, 曹雅忠, 仵均祥, 2014. 地下害虫蛴螬的发生与防治研究进展. 中国植保导刊, 34(10): 20 – 28]

Zhu JH, 2002. Study on application of entomopathogenic nematodes to control *Odontotermes formosanus* Shiraki on *Eucalyptus*. *J. Fujian For. Coll.*, 22(4): 366 – 370. [朱建华, 2002. 应用昆虫病原线虫防治桉树白蚁的研究. 福建林学院学报, 22(4): 366 – 370]

(责任编辑: 赵利辉)